

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR AL
DIPLOMA DE ESTUDIOS AVANZADOS**

**“Estudios fármaco-genéticos de pacientes con infección por VIH-1
tratados con regimenes antirretrovirales basados en estavudina:
asociación de los polimorfismos de la timidilato sintasa con los niveles
intracelulares de estavudina trifosfato.”**

Investigador Principal: M^a del Carmen Cabeza Brasa

Director del trabajo: Dr. Pere Domingo Pedrol

Universitat de Barcelona/ Departament de Medicina Interna

Junio 2010

RESUMEN.....	2
INTRODUCCIÓN.....	4
MATERIAL Y MÉTODOS.....	7
RESULTADOS.....	9
DISCUSIÓN	12
CONCLUSIONES.....	15
BIBLIOGRAFÍA.....	18
TABLAS.....	24

RESUMEN

Antecedentes: La actividad antirretroviral y la toxicidad de estavudina (d4T) depende de su metabolito trifosfato, la estavudina trifosfato (d4T-TP). Por tanto, las modificaciones en los niveles intracelulares de d4T pueden cambiar el perfil de la toxicidad de la estavudina.

Métodos: Se determinaron los niveles intracelulares de d4T-TP en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) por la prominencia en el cromatógrafo líquido conectado a un espectrómetro de masa triple-cuádruple. Los polimorfismos en los genes de la Timidilato sintasa (TS), Metilenetetrahidrofolato reductasa (MTHFR), dihidrofolato reductasa (DHFR), Transportador de folato reducido 1 (RFC1) y ciclina D1 (CCND1) fueron determinados por secuencia directa usando ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer o bien usando Fluidigm's Biomark system. Para los análisis estadísticos se usaron el test de la t de Student, el índice de correlación de Pearson, ANOVA de un factor con correcciones por el método de Bonferroni y una regresión logística escalonada.

Resultados: Se reclutaron 33 pacientes para este estudio transversal. Los niveles intracelulares de d4T-TP fueron de 11.50 (RIC: 5.75) fmol/10⁶ cels en pacientes con un genotipo de alta expresión del TS (*2/*3G, *3C/*3G and *3G/3G) mientras que en aquellos con un genotipo de baja expresión (*2/*2, *2/*3C and *3C/*3C), los niveles fueron de 20.65 (12.70) fmol/10⁶ cels (P = 0.0010). Los polimorfismos de los genes de MTHFR, DHFR, RFC1 y CCND1 no influyeron en la concentración intracelular de d4T-TP.

Conclusiones: Los niveles intracelulares de d4T-TP son determinados por los polimorfismos de los genes de timidilato sintasa.

Palabras clave: estavudina, estavudina trifosfato, timidilato sintasa, metilenetetrahidrofolato reductasa, dihidrofolato reductasa, ciclina D1, Toxicidad, pools de nucleótidos, vía metabólica folato, fármaco-genética

INTRODUCCIÓN

El síndrome de asociado al tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) lipodistrofia (HALS) es un serio problema de salud en pacientes infectados por el virus de inmunodeficiencia tipo 1 (VIH-1) con una prevalencia estimada de 24-60% entre los pacientes tratados [1-3]. Además, en estos pacientes, a menudo se asocia a dislipidemia, resistencia a la insulina e hipertensión arterial, representando un escenario de riesgo cardiovascular elevado en estos pacientes [4].

Aunque su patogénesis no es completamente conocida, las teorías de toxicidad por fármacos han sido consideradas de las más plausibles, y la visión actual sugiere que los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleósidos (ITIANs) contribuyen a este síndrome [5, 6]. Los análogos timidínicos como la zidovudina (AZT) y estavudina (d4T) han sido los principalmente implicados en el desarrollo de HALS en ensayos clínicos randomizados [7, 8], y hay un importante número de evidencias en estudios *in vitro* y *ex vivo* que unen el uso de estos fármacos con la aparición de efectos tóxicos mediados por toxicidad mitocondrial [9-11]. Se sabe que las concentraciones de ITIAN- trifosfato influyen tanto en el tratamiento antirretroviral como en los efectos tóxicos, éste último mediante inhibición competitiva de la ADN polimerasa *in vivo* [12-14]. Este mecanismo de toxicidad es un problema selectivo y específico, y por lo tanto, dependerá de manera muy importante, de la dosis del fármaco y de su concentración. Por esto, elevaciones en las concentraciones de ITIAN trifosfato influirán de manera significativa en la toxicidad de los ITIANs.

La timidilato sintetasa (TS) es una enzima del metabolismo de las pirimidinas que cataliza el paso de uridina a timidina para la formación del ADN. Si administramos nucleótidos exógenos como el d4T que es un análogo de la timidina, favorecemos el uso de éstos frente a los nucleótidos naturales. La producción del ADN tanto mitocondrial como celular se llevará a cabo mayoritariamente con los nucleótidos exógenos.

La Timidilato sintasa (TS, N^5 , N^{10} -metiletilenetetrahidrofolato: dUMP C-metiltransferasa; EC 2.1.1.45) cataliza de manera no reversible la metilación de deoxiuridina-5-monofosfato (dUMP) a deoxitimidina-5-monofosfato (dTMP), un precursor de la síntesis de DNA. Por lo tanto, es un enzima clave en la síntesis *de novo* de timidilato y el único enzima responsable de proporcionar los nucleótidos de timina necesarios para la síntesis de DNA [15]. El gen que codifica este enzima es polimórfico, teniendo repeticiones dobles (2R) o triples (3R) de una secuencia de 28bp en la región promotora y se ha demostrado que las células homocigotas 3R/3R sobreexpresan

ARNm de la TS comparadas con las células homocigotas 2R/2R [15, 16]. Más recientemente, se ha descrito un polimorfismo de nucleótido simple G>C en el nucleótido 20° de la segunda repetición del alelo 3R, que encabeza un locus tri-alelico (2R, 3RG, y 3RC) [17]. El alelo 3RC muestra una actividad transcripcional similar a la del alelo 2R.

La TS es un enzima clave en el metabolismo de folato. En esta vía metabólica, otros enzimas como el transportador de folato reducido 1 (RFC1), la metilenetetra-hidrofolato reductasa (MTHFR) y la dihidrofolato reductasa (DHFR) también pueden regular la actividad de la TS de una manera coordinada para un metabolismo eficiente de folato. Adicionalmente, el incremento del nivel de transcripción de varios de los genes anteriormente mencionados (TS, DHFR) se puede asociar con la transcripción de los factores E2F-1 y DP-1. El CCND1 interviene en la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (RB), liberando estas moléculas, parece necesario en este marco el estudio del genotipo CCND1. El RFC1, un intercambiador de aniones, es una proteína transmembrana que transfiere folato hidrofílico a través de la membrana celular. Los genes que codifican para la proteína RFC1 están localizados en la región 21q. Estudios recientes han sugerido que el polimorfismo G80A en el RFC1 se asocia con niveles alterados de folato [18]. La MTHFR cataliza la conversión de 5,10-metilenetetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato. Esta reacción enzimática genera residuos de metilo esenciales para la función de la TS. El gen de la MTHFR se localiza en el cromosoma 1p y los polimorfismos mejor caracterizados consisten en i) una transición 677C>T que resulta en una sustitución de alanina por valina en el denominado dominio catalítico de MTHFR, y ii) una transición 1298 A>C que resulta en la sustitución de glutamina por alanina en el supuesto dominio regulador [19]. La DHFR convierte el dihidrofolato (DHF) generado por la acción de la TS en tetrahidrofolato (THF). El gen de la DHFR se localiza en el cromosoma 5q. Un polimorfismo recientemente descrito que consiste en delección/inserción 19 bp que se encuentra en el intrón 1 ha demostrado influir en las alteraciones de los niveles de folato [20], y existen 3 polimorfismos en el promotor que fueron analizados (C-1610G/T; C-680A; A-317G) [21]. El gen de la ciclina D1 (CCND1) se sitúa en 11q13 y codifica la proteína ciclina D1 que juega un papel importante en la regulación del ciclo celular a través de sus interacciones con las quinasas dependientes de ciclina. EL CCND1 interviene en la fosforilación de la proteína del retinoblastoma en la transición de la fase G1 a la S, liberando E2F1 y DP-1 que aumentan la transcripción de varios genes

implicados en la replicación del DNA (TS, DHFR). El polimorfismo 870A>G del gen CCND1 afecta al lugar de la unión con el donante en el límite entre exon4/intrón 4, modulando la relación entre las isoformas del ARNm del CCND1 [22].

Nuestra hipótesis de trabajo es que las variaciones en los genes que intervienen en las vías metabólicas anteriormente mencionadas pueden influir en las concentraciones de niveles intracelulares de d4T trifosfato (d4T-TP) y de esta manera modular los efectos tóxicos de este fármaco por la alteración de los pools de nucleótidos. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio es encontrar una relación entre los polimorfismos genéticos de los genes que codifican los enzimas TS, MTHFR, DHFR, RFC1 y CCND1 y los niveles intracelulares de d4T-TP.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población estudiada

Todos los pacientes fueron reclutados en la misma clínica en el *Hospital de la Santa Creu i Sant Pau*, que atiende a una población de 1457 pacientes con infección por VIH-1 en seguimiento activo, y eran pacientes con un diagnóstico establecido de infección por VIH-1 en tratamiento. Los pacientes eran candidatos elegibles si tenían o no síndrome de lipodistrofia asociado al tratamiento antirretroviral de gran actividad (HALS) y estaban recibiendo estavudina (d4T) como parte de sus regímenes antirretrovirales. Los pacientes que estaban hospitalizados o presentaban un deterioro cognitivo franco como *delirium* o demencia durante el reclutamiento, no eran elegibles. Los pacientes con enfermedades oportunistas, neoplasias o fiebre de origen desconocido también eran excluidos del estudio. También eran excluidos aquellos pacientes que en el momento del reclutamiento estaban tomando algún fármaco que influyera en el metabolismo de la glucosa o en la distribución grasa como hormonas anabolizantes o corticoides sistémicos, hormona del crecimiento recombinante, o estimuladores del apetito. Se obtuvo consentimiento informado de todos los pacientes cuando entraban a formar parte del estudio. El diagnóstico de síndrome de inmunodeficiencia humana (SIDA) se basó en la definición de caso de *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) [23] El estudio fue aprobado por el Comité Ético del *Hospital de la Santa Creu i Sant Pau*.

Medidas de la composición corporal

Los sujetos fueron pesados en básculas calibradas después de quitarse los zapatos, la ropa de calle y otros artículos pesados. El Índice de masa corporal (BMI, siglas en inglés), se calculó dividiendo el peso en kilogramos por el cuadrado de la altura en metros. La cintura se midió en centímetros usando referencias anatómicas definidas en el “Third National Health and Nutrition Evaluation Survey” [24].

Las DEXAs (dual energy X-ray absorptiometry) de cuerpo entero (Hologic QDR-4500A Hologic, INC, 590 Lincoln St, Waltham, MA 02154, USA) fueron realizados por un único operador en todos los pacientes. Se determinó el porcentaje de grasa en los brazos, piernas y abdomen central (calculado de la masa de grasa versus la masa magra y la ósea) así como la masa magra corporal total en kilogramos.

Definición de HALS y síndrome metabólico

La presencia o ausencia de lipoatrofia, lipohipertrofia y síndrome mixto fue determinada según las definiciones del Lipodystrophy Scale Severity Score [referencia del CID, 25].

El síndrome metabólico fue definido de acuerdo a las guías de *U.S. National Cholesterol Education Program (NCEP) Adult Treatment Panel III* [26] y modificaciones recomendadas en el último *American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement* [27]. El síndrome metabólico fue definido como presentar tres o más de los siguientes factores de riesgo metabólico: 1) obesidad central (circunferencia de la cintura ≥ 80 cm en mujeres y ≥ 90 cm en hombres); 2) hipertrigliceridemia (triglicéridos en ayuno ≥ 1.69 mmol/l); 3) colesterol HDL bajo (HDL < 1.29 mmol/l en mujeres y < 1.04 mmol/l en hombres); 4) hiperglicemia (glucosa en ayunas ≥ 5.6 mmol/l o estar tomando antidiabéticos orales para el tratamiento de la diabetes tipo 2; e hipertensión (presión arterial sentado, tomada como media de 2 lecturas después de descansar al menos 10 min, o tomar medicación antihipertensiva de forma regular).

Medidas del laboratorio de bioquímica

Todos los análisis bioquímicos se realizaron después de un ayuno nocturno de 12 h y al menos 15 minutos después de la colocación de una vía periférica.

Los pacientes estuvieron sentados durante la extracción sanguínea y evitaron fumar al menos durante los 15 minutos anteriores a la extracción; el torniquete venoso se evitó siempre que fue posible y si fue necesario, se mantuvo menos de un minuto. Todas las

medidas lipídicas se realizaron con un sistema Hitachi 911 de Roche (Basel, Suiza). El colesterol total y los triglicéridos se midieron por un método enzimático estandarizado y el colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) mediante un método directo usando enzimas de polietilenglicol modificados PEGME) [28]. La fracción de colesterol de las lipoproteínas de baja densidad se midió después de una ultracentrifugación de acuerdo con el método recomendado por el Lipid Reserch Clinic, pero utilizando el método PEGME para el colesterol-HDL en vez de precipitación. El colesterol de la fracción VLDL fue medido como la fracción de $d < 1006 \text{ Kg/l}$ de la ultracentrifugación [29]. La resistencia a la insulina se halló por el HOMA-IR (*homeostasis model assessment method*) como el producto de las concentraciones de insulina plasmática ($\mu\text{unidades/ml}$) y glucosa plasmática (mmol/l) en ayunas, dividido entre 22.5 [30]. El valor de corte usado para definir la resistencia a la insulina fue de 3.8 [31]

Medidas de la concentración intracelular de d4T trifosfato

El d4T es de Moravek Biochemicals (CA, USA) y el Cl-ATP (2-cloroadenosin 5'-trifosfato) usado como estándar interno es de Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France). En resumen, después de obtener las muestras (sobre 7 mL), las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) serán preparadas mediante centrifugación con un medio de gradientes (Ficoll Histopaque 1077, Sigma) e inmediatamente serán almacenados a una temperatura alrededor de -80° , pendientes del análisis. Las PBMC se lisarán en 1 ml de metanol congelado/ Tris 0.05 M/HCl pH = 5; 70/30 (v/v) que contendrá IS, y después de la evaporación del metanol, la fracción 40-mL de la solución remanente se inyectara en el sistema LC-MS/MS system.

El LC-MS/MS consiste en una prominencia cromatógrafo líquido (Shimadzu, Champs sur Marne, France) conectado a un espectrómetro de masa triple-cuádruple TSQ Quantum Discovery (Thermo Fisher Scientific, Les Ulis, France) funcionando en el modo negativo ESI para la detección de ambos d4T – TP e IS [32]. El método cromatográfico líquido se usará de acuerdo a un método publicado previamente [33]. En estas condiciones, los tiempos de retención serán de entre 3.95 y 4.05 minutos para d4T-TP e IS respectivamente. La cantidad de d4T será determinada dentro del rango calibrado de entre 50 a 3000 femtomoles (fmol) por célula. Finalmente, las CMSP de cada muestra serán contadas usando un test bioquímico validado tal y como ha sido descrito previamente [34] para obtener los resultados en $\text{mol} / 10^6 \text{PBM}$

Análisis genotípicos

El ADN genómico fue extraído de los leucocitos periféricos mediante el procedimiento de precipitación de proteína por saturación de la solución con sales neutras [35]. En los genes de la Timidilato Sintasa (TS) se analizaron un número variable de repeticiones en tándem (VNTR) del polimorfismo de 28 bp y el polimorfismo de nucleótido simple G>C en la primera y segunda repetición. Un fragmento de DNA fue amplificado usando las condiciones y los primers de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) [15], y directamente secuenciado usando un analizador ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Estos cambios, sustituyendo G por C en un residuo crítico en el elemento de consenso USF E-box, abole la unión de USF-1 y altera la actividad transcripcional (de la transcriptasa). Los genotipos TS de los pacientes se clasificaron de acuerdo con Kawakami y Watanabe en 2 grupos: el tipo de alta expresión (*2/*3G, *3C/ *3G y *3G/ 3G) y el de baja expresión (*2/ *2, *2/ *3C y *3C/ *3C) [36].

Se analizaron los siguientes polimorfismos en los genes de la dihidfolato-reductasa (DHPR): i) C-1610G/T se determinó por secuencia directa usando un analizador ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA); ii) la inserción/delección en 19bp usando un método de PCR convencional; iii) la sustitución A-317G y iv) el cambio de C-680^a. Estos dos polimorfismos se analizaron usando un sistema Fluidigm's Biomark.

El sistema Fluidigm's Biomark está diseñado para la discriminación alélica de los análisis de la 5' nucleasa. Las muestras y los análisis de la expresión génica TaqMan Gene (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) se prepararon siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Las matrices dinámicas 48.48 usadas fueron descargadas usando un IFC Controller (Fluidigm Corporation), y las reacciones a tiempo real se realizaron y analizaron usando BioMark Real-Time PCR System and Analysis software (Fluidigm Corporation), respectivamente. Como control de calidad, se incluyeron muestras heterocigotas y homocigotas normalizadas en cada matriz y para cada genotipo.

El polimorfismo A80G en el gen RFC1, así como los 2 marcadores (C677T y A1298T) en el gen de la metil-tetra hidrofolato-reductasa (MTHFR) y el polimorfismo en el gen CCND1 se analizaron usando la plataforma anteriormente descrita basada en matrices dinámicas microfluidas.

Análisis estadísticos

Los datos se expresaron como medias \pm desviación estándar (SD) o medianas con rango intercuartílico. Los datos que no siguieron una distribución normal, se determinaron usando el test Kolmogorov-Smirnov donde fueron transformados logarítmicamente antes del análisis. El test t de Student se usó para la comparación entre 2 grupos, el índice de correlación de Pearson o ANOVA con un solo factor y múltiples pruebas se corrigieron usando el método de Bonferroni. Las frecuencias de los alelos y el genotipo se compararon entre poblaciones con el test del chi-cuadrado. Todos los valores de P se definieron de manera bilateral; se consideraron estadísticamente significativos aquellos análisis con un valor de P menor de 0.05. Todos los análisis se realizaron con SPSS versión 17.0 (SPSS, Chicago, IL). Los análisis de regresión logística escalonada se usaron para examinar la asociación entre los niveles de d4T intracelulares y otros parámetros con los polimorfismos TS. Las variables seleccionadas para esta regresión escalonada fueron aquellas que se correlacionaban de manera significativa con los polimorfismos TS (después del método de Bonferroni para múltiples pruebas).

RESULTADOS

Población estudiada

Se reclutaron 33 pacientes caucásicos con infección por el VIH-1 en tratamiento basado en estavudina. Los datos demográficos y el estatus viro-inmunológico de la población estudiada se muestran en la Tabla 1. De ellos 27 eran hombres (81.1%) y 6 mujeres (18.2%) con una media de edad de 45.1 ± 8.4 años (mediana 44.0 [IQR: 7 años]). Las vías de adquisición de la infección por el VIH-1 fueron: hombres homosexuales (13, 39.4%), uso de drogas por vía parenteral (12, 36.4%), y contacto heterosexual (8, 24.2%). La media de duración de la infección por VIH-1 era de 13.9 ± 5.2 años (mediana: 13.0 [IQR: 7 años]). Trece pacientes (39.4%) habían presentado previamente una enfermedad definitoria de SIDA. Once pacientes estaban coinfectados con el virus de la hepatitis C (33.3%), mientras que únicamente tres pacientes (9.1%) tenían infección crónica por el virus de la hepatitis B. Sólo dos pacientes (9.1%) estaban tomando al mismo tiempo sulfamidas y ningún participante tomaba ninguna otra medicación aparte de los antirretrovirales.

Distribución de los genotipos

Los 33 pacientes que cumplían los criterios de inclusión fueron genotipados. En la tabla 2 se muestran las frecuencias de los alelos *2, *3C y *3G de la TS, los alelos C677T y A1298T de la metilenetetrahidrofolato reductasa (MTHFR), los alelos 19 bp ins/del, A-317G, C-680A, y C-1610G de la dihidrofolato reductasa (DHFR) y el A80G del transportador de folato reducido 1 (RFC1)

Con respecto a los genotipos de la TS, 15 pacientes (45.4%) presentaban genotipos de alta expresión (2/3G, 3C/3G, 3G/3G) y 18 presentaban genotipos de baja expresión (2/2, 2/3C, 3C/3C). La correlación entre el genotipo de la TS y los datos demográficos, antropométricos, metabólicos, sobre la distribución grasa y las variables viro-inmunológicas se muestran en la tabla 3.

Fármacos antirretrovirales y situación inmuno-virológica

La mayor parte de los pacientes (28, 84.8%) tenían una carga viral indetectable en el momento del estudio. La media de la carga viral plasmática de los cinco pacientes que tenían carga viral detectable, era de 215 copias/ml (rango: 109-473 copias/ml). La media del recuento de CD4 era de 627 ± 311 cels/mm³ (mediana: 502 [IQR: 408] cels/mm³). La cifra de CD4 nadir fue < 100 cels/mm³ en 15 pacientes (45.4%), y < 200 cels/mm³ en 21 pacientes (63.4%). La carga viral máxima estaba fue de más de 5 log₁₀ en 15 pacientes (45.4%). La exposición acumulada a fármacos antirretrovirales relacionada con el genotipo de la TS se muestra en la tabla 4

Concentraciones intracelulares de d4T-TP y genotipos

La mediana de las concentraciones de d4T-TP fue de 17 fmol/10⁶ cels (rango intercuartílico [IQR]: 11.47 fmol/10⁶ cels). La mediana de las concentraciones de d4T-TP por pacientes con diferente genotipo se muestra en la tabla 5, donde se puede observar que el genotipo de la TS influencia de manera individual los niveles de d4T-TP intracelulares de forma estadísticamente significativa. Sin embargo, combinaciones de genotipos de TS con otros genotipos pueden maximizar o minimizar las diferencias en los niveles de d4T-TP intracelulares. Así mismo, con respecto a los genotipos de la MTHFR, la combinación de un genotipo de baja expresión de TS con la MTHFR 677 C/T y MTHFR 1298 A/A o C/C, dieron niveles de d4T-TP de 20.70 (IQR: 24.00) fmol/10⁶ cels/l, mientras que en la otra parte del espectro, individuos con la combinación de un genotipo de alta expresión de TS con MTHFR 677 T/T y MTHFR 1298 A/C tenían unos niveles de d4T-TP de 11.50 (IQR: 6.10) fmol/10⁶ cels/l.

Para la DHFR, la combinación de genotipos que causan niveles más elevados de d4T intracelulares eran aquellos de baja expresión para la TS y DHFR del/del, -317 G/G, -680 C/A y -1610 C/T, con 73.0 fmol/10⁶ cels/l, mientras que en el lado opuesto estaba la combinación de genotipos de alta expresión de TS y DHFR ins/ins, -317 A/A con unos niveles de d4T-TP 9.90 (IQR: 2.95) fmol/10⁶ cels/l. ,

Para la RFC1, la combinación de genotipos que causan niveles elevados de d4T-TP eran aquellos de baja expresión de la TS y RFC1 G/G (20.60 [49.50] fmol/10⁶ cels/l), mientras que los niveles bajos de d4T-TP intracelular se relacionaban con los genotipos de alta expresión de la TS y RFC1 A/A (8.65 [2.30] fmol/10⁶ cels/l).

DISCUSIÓN

La farmacogenética es de aplicación reciente en el campo de la terapia antirretroviral. Hasta ahora se han descrito un número de polimorfismos que modifican el metabolismo de los fármacos y eventualmente su perfil tóxico. El polimorfismo G5516T en el CYP2B6 se asoció con unas concentraciones plasmáticas de efavirez aproximadamente 3 veces más altas durante al menos las primeras 24 semanas de tratamiento antirretroviral y con mayor número de efectos secundarios en el sistema nervioso central [38,39]. Una frecuencia mayor de este polimorfismo en afro-americanos parece ser la explicación por la que esta población presenta un menor aclaramiento de efavirenz [40, 41]. Sobre el 5-10% de la población general tiene un defecto en la actividad de la conjugación de la bilirrubina conocido como síndrome de Gilbert [42,43], causado por la inserción TA en la secuencia natural (salvaje) A(TA)6TAA del promotor UGT1A1. La homocigosidad OK de A(TA)7TAA del genotipo del síndrome de Gilbert reduce la actividad de conjugación de la bilirrubina en un 50% [44]. La hiperbilirrubinemia a expensas de la bilirrubina no conjugada ocurre a menudo durante el tratamiento con inhibidores de la proteasa del VIH-1 indinavir y atazanavir [45, 46]. Estos fármacos compiten con la bilirrubina para unirse a UGT1A1. Aunque habitualmente es asintomático, algunos pacientes desarrollan una ictericia moderada que es causa de que abandonen el tratamiento.

El factor de necrosis tumoral (TNF)- α parece que está involucrado en la patogénesis de la lipodistrofia [47]. Los niveles elevados de TNF- α en el tejido adiposo parecen estar relacionados con lipodistrofia y el TNF- α puede influir en la diferenciación de los adipocitos y en la sensibilidad a la insulina [48, 49]. Una variante en la posición 238G/A del alelo del TNF- α se encontró presente en el 15% de los pacientes con

lipodistrofia pero no en aquellos sujetos sin lipodistrofia [50]. De manera similar, entre 191 pacientes blancos en Australia, de todos aquellos que presentaban lipoatrofia [51], el inicio de la pérdida de grasa era más rápido en aquellos que llevaban la variante del alelo 238 G/A.

La tubulopatía renal proximal ha sido asociada significativamente con una sustitución simple G>A en la posición 1249 de *ABCC2* (también llamado “MRP2”, que codifica la proteína que media la resistencia a múltiples fármacos [MRP] 2) y con un haplotipo *ABCC2* comparando 4 polimorfismos, incluyendo 1249 G>A [52]. Además, una sustitución T>A en la posición 3563 y un haplotipo que incluye este polimorfismo, se relacionaron con la ausencia de toxicidad renal [52].

Nuestro estudio muestra que los polimorfismos funcionales de los genes que codifican la TS pueden tener implicación cuando el paciente recibe tratamiento antirretroviral que contiene estavudina. Estos polimorfismos pueden causar variaciones substanciales y significantes en las concentraciones de d4T-TP, que es la fracción farmacológica activa (y tóxica) de la estavudina dado que inhibe tanto la transcriptasa inversa del VIH-1 [53, 54] y la DNA polimerasa – α de los mamíferos [55]. Hemos encontrado también que los diferentes polimorfismos que codifican la MTHFR, DHFR, RFC1 y CCND1 no tienen un impacto significativo en los niveles intracelulares de d4T-TP cuando se consideran de manera individual, pero se comportan a coadyuvantes con los polimorfismos de la TS.

Las concentraciones intracelulares de d4T-TP son fidedignas ya que el método cuantitativo usado presentaba media de precisión (rango) y media de exactitud (SD) de 9.8% (7.1-14.4) y 10.16% (10.0), respectivamente, sobre el rango completo de calibración (valores de control de calidad de los ensayos). Además, los resultados obtenidos en este estudio son comparables con los datos previamente publicados [56-58].

La TS es un enzima clave en la vía de los nucleótidos biosintéticos que metila la deoxiuridina (dUMP) para producir deoxytimidina (dTMP), y la reacción de la TS es la única fuente de timidilato en la célula y es esencial para la replicación del ADN [15].

La variabilidad de la expresión de la TS puede estar relacionada con un número variable de polimorfismos en las repeticiones en tándem (VNTR) de la región promotora. Recientemente se ha descrito un cambio común G>C (SNP) en la segunda repetición de los alelos que contiene 3 repeticiones; por lo tanto, la combinación de SNP y VNTR permite la definición de la diferencia. Los alelos TS que muestran

distintos patrones de expresión génica. Nosotros encontramos que los polimorfismos unidos a enzimas de baja expresión se asocian con un aumento de los niveles de d4T-TP, lo que puede tener consecuencias en términos de toxicidad, puesto que como un análogo timidínico, el d4T es un inhibidor competitivo con el 2'-deoxytimidin-5'-trifosfato (dTTP) por la polimerasa [59].

Un paso clave en la fisiopatología de la toxicidad y la farmacología de los NRTI es la regulación del tamaño del *pool* de desoxirribonucleótidos naturales en la mitocondria que afecta la replicación del ADN. Por el contrario, la disregulación en la fosforilación y defosforilación podría alterar la replicación del ADNmt

Se esperaría que los genotipos de la TS asociados con una reducción de la actividad de la enzima incrementaran la ventaja competitiva del d4T-TP con respecto al *pool* (disminuido) del dTTP endógeno [60]. Más aún, los *pools* disminuidos de dTTP estimularían la actividad de la timidin kinasa debido al *feedback* por inhibición del producto final de esta vía metabólica [61]. Esto puede conllevar un pronunciado aumento de la *ratio* intracelular NRTI- trifosfatos/dTP. Hay una evidencia farmacológica de que los agentes que inhiben la biosíntesis *de novo* de los nucleótidos tienen la habilidad de incrementar la fosforilación de d4T [62].

La hidroxiurea, un inhibidor de ribonucleótido- reductasa que también actúa disminuyendo los *pools* de dTTP puede causar similares efectos en la fosforilación del d4T [63]. De manera interesante, la combinación de hidroxiurea con d4T se ha asociado con un exceso de toxicidad, especialmente pancreatitis y neuropatía periférica, en diferentes estudios [64-66]. Los diferentes genotipos de los VNRT en la región promotora de la TS (2R/2R, 2R/3R, y 3R/3R) ocurren a diferentes frecuencias en diferentes poblaciones. En los caucásicos, es heterocigota aproximadamente el 50% de la población, y cada uno de los genotipos homocigotos se encuentran en aproximadamente en el 25% de la población. La distribución es igual en la población negra y en la población del sudoeste asiático [67, 68]. Sin embargo, los sujetos homocigotos de la triple repetición eran 2 veces más frecuentes en la población china (67%) que en los sujetos caucásicos (38%) [67]. Esto puede explicar porqué la lipodistrofia asociada a la infección por VIH-1, toxicidad que ha sido relacionada directamente con el uso de análogos timidínicos usados ampliamente por todo el mundo, ha sido tan escasamente reportada en los países asiáticos del Lejano Oriente (Norte de China y Japón) [69].

La MTHFR cataliza una conversión irreversible de 5-10-metilenetetrahydrofolato a 5-metiltetrahydrofolato. El paso anterior es fundamental en la síntesis del ADN porque actúa como cofactor en la conversión de dUMP a dTMP por la TS [70]. Polimorfismos en los genes de la MTHFR pueden influir en los *pools* intracelulares de folato, y por tanto, la actividad de la TS puede modificarse. Hasta el momento se han reconocido 2 polimorfismos C677T, y A1298C, ambos asociados con un descenso de la actividad de la enzima [71]. Hemos examinado ambos polimorfismos y aunque ninguno de ellos individualmente determina cambios significativos en los niveles intracelulares de d4T-TP, ambos modulan los efectos de los genotipos de la TS en mayor o menor medida. Otros enzimas implicados en el metabolismo del folato, y consecuentemente con un potencial impacto sobre el funcionalismo de la TS, son la DHFR y la RFC1. La DHFR está involucrada en la reducción del dihydrofolato, generado durante la síntesis del timidilato, a tetrahydrofolato para mantener cantidades adecuadas de folato para la síntesis de DNA y re-metilación de la homocisteína [72]. Hay diversos polimorfismos de la DHFR descritos. Entre ellos, nosotros hemos analizado 19-bp ins/del, -317 A>G, -680 C>A, y -1610 C>G [20, 21]. De manera similar a los polimorfismos de la MTHFR, ninguno de ellos modificaba significativamente los niveles intracelulares de d4T, aunque sí modulan los efectos de los polimorfismos de la TS. El RFC1, también llamado SLC19A1, es un transportador esencial de folato y funciona como un intercambiador de aniones bidireccional, tomando cofactores del folato y exportando diversos aniones orgánicos. El polimorfismo G80A en el gen del RFC1 ha mostrado estar asociado con alteraciones del folato y de la homocisteína en sujetos sanos [73]. Encontramos que esta variación genética no inducía modificaciones sustanciales en los niveles intracelulares de d4T.

También consideramos la implicación de un sistema biológico que regula la disponibilidad en la célula de 2 factores de transcripción (DP-1 y E2F-1) que aumentan la transcripción de entre otros, los genes de la TS, de la DHFR y los de la timidinkinasa: uno de los miembros de la familia de las ciclinas, CCND1, que junto con las quinasas dependientes de ciclina, fosforila e inactiva la proteína del retinoblastoma y promueve la progresión a través de la fase G1-S del ciclo celular.

Durante este proceso, los 2 factores de transcripción anteriormente mencionados, son liberados en la célula. Hemos encontrado que el polimorfismo G>A en el nucleótido 870 del gen del CCND1 no afectaba a los niveles intracelulares de d4T-TP

El presente estudio transversal, que incluye un limitado número de pacientes, ha mostrado una asociación significativa entre el genotipo de los genes de la TS y los niveles de d4T intracelulares en pacientes con infección por VIH-1 con regímenes antirretrovirales basados en d4T.

Hasta donde conocemos, este es el primer estudio farmacogenético que demuestra la implicación que tiene la vía metabólica del folato en la toxicidad por d4T.

La farmacogenética, y especialmente, la toxicogenética, se están convirtiendo en un campo de investigación cada vez más importante en la terapia antirretroviral para la infección por el VIH-1. Los factores genéticos pueden alterar el metabolismo farmacológico y la actividad y pueden predecir la toxicidad y/o la eficacia de los fármacos.

La determinación de polimorfismos en enzimas que metabolizan sustancias xenobióticas antes de la administración de la terapia antirretroviral podría ofrecer nuevas estrategias para optimizar e individualizar la terapia antirretroviral.

CONCLUSIONES

Durante los últimos años se han descubierto diversos polimorfismos que pueden modificar el metabolismo de distintos fármacos y por lo tanto, alterar su perfil tóxico. Este estudio muestra que los polimorfismos funcionales de los genes que codifican la TS pueden tener un papel importante en pacientes que reciben tratamiento antirretroviral basado en estavudina debido principalmente a variaciones importantes en las concentraciones de d4T-TP.

Los diferentes polimorfismos de los genes que codifican los distintos enzimas del metabolismo del folato, no influyen de manera significativa en los niveles intracelulares de d4T-TP cuando se consideran de manera individual, pero se comportan como coadyuvantes a los polimorfismos de la TS.

Los 2 polimorfismos conocidos de los genes de la MTHFR descritos hasta ahora, son el C677T y el A1298C. Ambos polimorfismos se asocian con un descenso de la actividad de la enzima a través de la influencia que ejercen sobre los *pools* intracelulares de folato.

Este estudio transversal ha mostrado una asociación significativa entre el genotipo de los genes de la TS y los niveles de d4T intracelulares en pacientes con infección por VIH-1 con regímenes antirretrovirales basados en d4T. A pesar de que el tamaño

muestral es muy pequeño, es el primer estudio farmacogenético que demuestra la implicación de la vía metabólica del folato en la toxicidad por d4T.

Los factores genéticos pueden alterar el metabolismo farmacológico y la actividad y pueden predecir la toxicidad y/o la eficacia de los fármacos.

No estamos lejos del día en el que la elección de un determinado tratamiento antirretroviral se base en los factores genéticos del propio paciente.

Ayuda financiera

Este trabajo está financiado en parte por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS 02/1280, 05/1591, 07/0976, 08/00256), la Fundación para la Prevención del SIDA en España (FIPSE 36610, 36572/06) y la Red de Investigación en SIDA (RIS RD06/006/0022, RD06/0006/1004).

BIBLIOGRAFÍA

1. Lichtenstein KA. Redefining lipodystrophy syndrome: risks and impact on clinical decision making. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005; 39: 395-400.
2. Bernasconi E, Boubaker K, Junghans C, et al. Abnormalities of body fat distribution in HIV-infected persons treated with antirretroviral drugs: The Swiss HIV Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; 31: 50-5.
3. Miller J, Carr A, Emery S, et al. HIV lipodystrophy: prevalence, severity and correlates of risk in Australia. *HIV Med* 2003; 4: 293-301.
4. Grinspoon S, Carr A. Cardiovascular risk and body-fat abnormalities in HIV-infected adults. *N Engl J Med* 2005; 352: 48-62.
5. Nolan D, Hammond E, James I, McKinnon E, Mallal S. Contribution of nucleoside-analogue reverse transcriptase inhibitor therapy to lipoatrophy from the population to the cellular level. *Antivir Ther* 2003; 8: 617-26.
6. Nolan D, Reiss P, Mallal S. Adverse effects of antirretroviral therapy for HIV infection: a review of selected topics. *Expert Opin Drug Saf* 2005; 4: 201-18.
7. Gallant JE, Staszewski S, Pozniak AL, et al. Efficacy and safety of tenofovir DF vs stavudine in combination therapy in antirretroviral-naïve patients: a 3-year randomized trial. *JAMA* 2004; 292: 191-201.
8. Gallant JE, DeJesus E, Arribas JR, et al. Tenofovir DF, emtricitabine, and efavirenz vs. zidovudine, lamivudine, and efavirenz for HIV. *N Engl J Med* 2006; 354: 251-60.
9. Lewis W, Day BJ, Copeland WC. Mitochondrial toxicity of NRTI antiviral drugs: an integrated cellular perspective. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2: 812-22.
10. Jones SP, Qazi N, Morel J, et al. Assessment of adipokine expression and mitochondrial toxicity in HIV patients with lipoatrophy on stavudine- and zidovudine-containing regimens. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005; 40: 565-72.
11. Caron M, Auclair M, Lagathu C, et al. The HIV-1 nucleoside reverse transcriptase inhibitors stavudine and zidovudine alter adipocyte functions in vitro. *AIDS* 2004; 18: 2127-36.
12. Kakuda TN. Pharmacology of nucleoside and nucleotide reverse transcriptase inhibitor-induced mitochondrial toxicity. *Clin Ther* 2000; 22: 685-708.
13. Anderson PL, Kakuda TN, Lichtenstein KA. The cellular pharmacology of nucleoside- and nucleotide-analogue reverse-transcriptase inhibitors and its relationship to clinical toxicities. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 743-53.

14. Sales SD, Hoggard PG, Sunderland D, Khoo SH, Hart CA, Back DJ. Zidovudine phosphorylation and mitochondrial toxicity in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001; 177: 54-8.
15. Horie N, Aiba H, Oguro K, Hojo H, Takeishi K. Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. *Cell Struct Funct* 1995; 20: 191-7.
16. Kawakami K, Salonga D, Park JM, et al. Different lengths of a polymorphic repeat sequence in the thymidylate synthase gene affect translational efficiency but not its gene expression. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 4096-101.
17. Mandola MV, Stoehlmacher J, Muller-Weeks S, et al. A novel single nucleotide polymorphism within the 5' tandem repeat polymorphism of the thymidylate synthase gene abolishes USF-1 binding and alters transcriptional activity. *Cancer Res* 2003; 63(11):2898-2904.
18. Dervieux T, Furst D, Lein DO, et al. Polyglutamation of methotrexate with common polymorphisms in reduced folate carrier, aminoimidazole carboxamide ribonucleotide transformylase, and thymidylate synthase are associated with methotrexate effects in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 2766-74.
19. Toffoli G, De Mattia E. Pharmacogenetic relevance of MTHFR polymorphisms. *Pharmacogenomics*. 2008;9:1195-206.
20. Johnson WG, Stenroos ES, Spychala JR. New 19 bp deletion polymorphism in intron -1 of dihydrofolate reductase (DHFR): a risk factor for spina bifida acting in mothers during pregnancy? *Am J Med Genet* 2004; 124A: 339-45.
21. Dulucq S, St-Onge G, Gagne V, et al. DNA variants in dihydrofolate reductase gene and outcome in childhood ALL. *Blood*. 2008; 111: 3692-700.
22. Papadimitrakopoulou V, Izzo JG, Liu DD, et al. Cyclin D1 and cancer development in laryngeal premalignancy patients. *Cancer Prev Res* 2009; 2: 14-21.
23. Centers for Disease Control. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance for case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR* 1993; 41 (RR-17): 1-13.
24. Lemieux S, Prud'homme D, Bouchard C, Tremblay A, Despres JP. A single threshold of waist girth identifies normal-weight and overweight subjects with excess visceral adipose tissue. *Am J Clin Nutr* 1996; 64: 685-93.
25. Domingo P, Cabeza MC, Pruvost A, et al. Relationship between HIV/highly active antiretroviral therapy (HAART)-associated lipodystrophy syndrome and stavudine triphosphate intracellular levels in patients with stavudine-based antiretroviral regimens. *Clin Infect Dis* (In Press)

26. Executive Summary of the Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001; 285: 2486-97.
27. Grundy SM, Cleeman JJ, Daniels SR, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 2005; 112: 2735-52.
28. Sugiuchi H, Uji Y, Okabe K. Direct measurement of high-density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glycol-modified enzymes and sulphated alpha-cyclodextrin. *Clin Chem* 1995; 41: 717-23.
29. Hainline A, Karon J, Lippel K. Lipid Research Clinic Program. Manual of Laboratory Operations, Lipids and lipoprotein analysis. 2nd ed.. Washington, D.C.: Govt. Printing Office, 2000.
30. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment. *Diabetologia* 1985; 28: 412-19.
31. Ascaso JF, Romero P, Real JT, Lorente RI, Martinez-Valls J, Carmena R. Abdominal obesity, insulin resistance, and metabolic syndrome in a southern European population. *Eur J Intern Med* 2003; 14:101-6.
32. Pruvost A, Becher F, Bardouille P, et al. Direct determination of phosphorylated intracellular anabolites of stavudine (d4T) by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2001;15: 1401-8.
33. Pruvost A, Théodoro F, Agrofoglio L, Negredo E, Bénech H, Specificity enhancement with LC-positive ESI-MS/MS for the measurement of nucleotides: application to the quantitative determination of carbovir triphosphate, lamivudine triphosphate and tenofovir diphosphate in human peripheral blood mononuclear cells. *J Mass Spectrom*. 2008; 43: 224-33.
34. Bénech, H., F. Theodoro, A. Herbet, et al. Peripheral blood mononuclear cell counting using a DNA-detection-based method. *Anal. Biochem* 2004; 330: 172–4.
35. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
36. Kawakami K, Watanabe G. Identification and functional analysis of single nucleotide polymorphism in the tandem repeat sequence of thymidylate synthase gene. *Cancer Res* 2003; 63: 6004-7.
37. Reich DE, Goldstein DB. Detecting association in a case-control study while correcting for population stratification. *Genet Epidemiol* 2001; 20: 4-16.
38. Haas DW, Ribaud HJ, Kim RB, et al. Pharmacogenetics of efavirenz and central nervous system side effects: an Adult AIDS Clinical Trials Group study. *AIDS* 2004; 18: 2391-400.

39. Marzolini C, Telenti A, Decosterd LA, Greub G, Biollaz J, Buclin T. Efavirenz plasma levels can predict treatment failure and central nervous system side effects in HIV-1-infected patients. *AIDS* 2001; 15: 71–5.
40. Barrett JS, Joshi AS, Chai M, Ludden TM, Fiske WD, Pieniaszek HJ Jr. Population pharmacokinetic meta-analysis with efavirenz. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2002; 40: 507–19.
41. Pfister M, Labbe L, Hammer SM, et al. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of efavirenz, nelfinavir, and indinavir: Adult AIDS Clinical Trial Group Study 398. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 130–7.
42. Strassburg CP, Manns MP. Jaundice genes and promoters. *J Hepatol* 2000; 33: 476–9.
43. Beutler E, Gelbart T, Demina A. Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) promoter: a balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism?. *Proc Natl Acad Sci US* 1998; 95: 8170–4.
44. Raijmakers MT, Jansen PL, Steegers EA, Peters WH. Association of human liver bilirubin UDP-glucuronyltransferase activity with a polymorphism in the promoter region of the UGT1A1 gene. *J Hepatol* 2000; 33: 348–51.
45. Zucker SD, Qin X, Rouster SD, et al. Mechanism of indinavir-induced hyperbilirubinemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 12671–6.
46. Rotger M, Taffe P, Bleiber G, et al. Gilbert syndrome and the development of antirretroviral therapy-associated hyperbilirubinemia. *J Infect Dis.* 2005; 192: 1381-6.
47. Domingo P, Vidal F, Domingo JC, et al. Tumor necrosis factor alpha in fat redistribution syndromes associated with combination antirretroviral therapy: its role in subcutaneous adipocyte apoptosis. *Eur J Clin Invest* 2005; 35: 771-80.
48. Giralt M, Domingo P, Guallar JP, et al. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection alters gene expression in adipose tissue, contributing to HIV/highly active antirretroviral therapy-associated lipodystrophy. *Antivir Ther* 2006; 11: 729-40.
49. Sethi JK, Hotamisligil GS. The role of TNF alpha in adipocyte metabolism. *Semin Cell Dev Biol* 1999; 10: 19–9.
50. Maher B, Alfrevic A, Vilar FJ, Wilkins EG, Park BK, Pirmohamed M. TNF-alpha promoter region gene polymorphisms in HIV-positive patients with lipodystrophy. *AIDS* 2002; 16: 2013–8.
51. Nolan D, Moore C, Castley A, et al. Tumour necrosis factor-alpha gene -238G/A promoter polymorphism associated with a more rapid onset of lipodystrophy. *AIDS* 2003; 17: 121–3.

52. Izzedine H, Hulot JS, Villard E, et al. Association between *ABCC2* gene haplotypes and tenofovir-induced proximal tubulopathy. *J Infect Dis* 2006; 194: 1481–91.
53. Mitsuya H, Weinhold KJ, Furman PA, et al. 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 7096–100.
54. Furman PA, Fyfe JA, St Clair MH, et al. Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 8333–7.
55. Lewis, W, Dalakas MC. Mitochondrial toxicity of antiviral drugs. *Nature Med* 1995; 1: 417–22.
56. Becher F, Pruvost A, Goujard C, et al. Improved method for the simultaneous determination of d4T, 3TC and ddI intracellular phosphorylated anabolites in human peripheral-blood mononuclear cells using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2002; 16: 555–65.
57. Salmon-Céron D, Lassalle R, Pruvost A, et al. Interferon-ribavirin in association with stavudine has no impact on plasma human immunodeficiency virus (HIV) type 1 level in patients coinfecting with HIV and hepatitis C virus: a CORIST-ANRS HC1 trial. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 1295–304.
58. Compain S, Durand-Gasselin L, Grassi J, Benech H. Improved method to quantify intracellular zidovudine mono- and triphosphate in peripheral blood mononuclear cells by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2007; 42: 389–404.
59. Lewis W, Simpson JF, Meyer RR. Cardiac mitochondrial DNA polymerase-gamma is inhibited competitively and noncompetitively by phosphorylated zidovudine. *Circ Res* 1994; 74: 344–8.
60. Balzarini J. Effect of antimetabolite drugs of nucleotide metabolism on the anti-human immunodeficiency virus activity of nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Pharmacol Ther* 2000; 87: 175–87.
61. Bresnick E, Karjala R. End product inhibition of thymidine kinase activity in normal and leukemic leukocytes. *Cancer Res* 1964; 24: 841–6.
62. Gao WY, Johns DG, Tanaka M, Mitsuya H. Suppression of replication of multidrug-resistant HIV type 1 variants by combinations of thymidylate synthase inhibitors with zidovudine or stavudine. *Mol Pharmacol* 1999; 55: 535–40.

63. Gao W-Y, Johns DG, Mitsuya H. Anti-human immunodeficiency virus type 1 activity of hydroxyurea in combination with 29,39-dideoxynucleosides. *Mol Pharmacol* 1994; 46: 767–72.
64. Rutschmann OT, Vernazza PL, Bucher HC, et al. Long-term hydroxyurea in combination with didanosine and stavudine for the treatment of HIV-1 infection. *Swiss HIV Cohort Study. AIDS* 2000; 14: 2145-51.
65. Moore RD, Wong WM, Keruly JC, McArthur JC. Incidence of neuropathy in HIV-infected patients on monotherapy versus those on combination therapy with didanosine, stavudine and hydroxyurea. *AIDS* 2000; 14: 273-8.
66. Moore RD, Keruly JC, Chaisson RE. Incidence of pancreatitis in HIV-infected patients receiving nucleoside reverse transcriptase inhibitor drugs. *AIDS* 2001; 15: 617-20.
67. Marsh S, Collie-Duguid ESR, Li T, Liu X, McLeod HL. Ethnic variation of the thymidylate enhancer region polymorphism among Caucasian and Asian populations. *Genomics* 1999; 58: 310-2.
68. Marsh S, Ameyaw MM, Githang J, Indalo A, Ofori-Adjei D, McLeod HL. Novel Thymidylate Synthase Enhancer Region Alleles in African Populations. *Human Mutation* 2000; 16: 528.
69. Chang KH, Kim JM, Song YG, Lee HC, Lim SK. Does Race Protect an Oriental Population From Developing Lipodystrophy in HIV-infected Individuals on HAART?. *J Infect* 2002; 44: 33-8.
70. De Mattia E, Toffoli G. C677T and A1298C MTHFR polymorphisms, a challenge for antifolate and fluoropyrimidine-based therapy personalisation. *Eur J Cancer* 2009; 45: 1333-51.
71. Sharp L, Little J. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2004; 159: 423-43.
72. Gellekink H, Blom HJ, van der Linden IJ, den Heijer M. Molecular genetic analysis of the human dihydrofolate reductase gene: relation with plasma total homocysteine, serum and red blood cell folate levels. *Eur J Hum Genet* 2007; 15: 103-9.
73. Chango A, Emery-Fillon N, de Courcy GP, et al. A polymorphism (80G>A) in the reduced folate carrier gene and its association with folate status and homocysteinemia. *Mol Genet Metab* 2000; 70: 310–5.

Tabla 1. Datos demográficos y estatus viro-inmunológicos de la población estudiada

Parámetro	Valor
Edad en años, mediana (IQR)	44.0 (7.0)
Varones, n (%)	27 (81.8)
Vías de adquisición de la infección por VIH	
Varones homosexuales (%)	13 (39.4)
Heterosexuales (%)	8 (24.2)
UDVP (%)	12 (36.4)
Años desde el diagnóstico, mediana (IQR)	13.0 (7.0)
Fumadores (%)	24 (72.7)
Abuso de Alcohol (%)	1 (6.2)
Diagnóstico previo de SIDA (%)	13 (39.4)
Co-infection VHC (%)	11 (33.3)
Co-infection VHB (%)	3 (9.1)
CD4, mediana (IQR), cells/mm ³	502 (408)
Aumento CD4 (IQR), cells/mm ³	383 (418)
CD8, mediana (IQR), cells/mm ³	1024 (614)
Aumento CD8 (IQR), cells/mm ³	600 (501)
CD4 + nadir < 100 cells/mm ³ (%)	15 (45.4)
CD4 + nadir < 200 cells/mm ³ (%)	21 (63.6)
Carga viral, mediana (IQR), log ₁₀ , copias/ml	1.28 (0)
Carga viral maxima ≥ 5 log ₁₀ , copias/ml (%)	15 (45.4)
Descenso de carga viral, median (IQR), log ₁₀ , copias/ml	-3.38 (-1.62)
IQR =rango intercuartílico, HTSX = heterosexuales, UDVP= usuarios de drogas por vía parenteral, SIDA = síndrome de inmunodeficiencia adquirida , VHC = virus hepatitis C, VHB= virus hepatitis B.	

Tabla 2. Distribución de los polimorfismos de la f TS, MTHFR, DHFR y RFC1 en la población estudiada

Frecuencia de los alelos de la TS						
	2R		3C		3G	
Total, n (%)	24 (36.4)		25 (37.9)		17 (25.7)	
Hombres, n (%)	22 (40.7)		19 (35.2)		13 (20.1)	
Mujeres, n (%)	2 (16.7)		6 (50.0)		4 (33.3)	
P = 0.2922 for differences between males and females						
Distribución de los genotipos de la TS						
	2R/2R		2R/3R		3R/3R	
		2R/3C	2R/3G	3C/3C	3C/3G	3G/3G
Total, n (%)	4 (12.1)	9 (27.3)	7 (21.2)	5 (15.1)	6 (18.2)	2 (6.1)
Hombres, n (%)	4 (14.8)	8 (29.6)	6 (22.2)	3 (11.1)	5 (18.5)	1 (3.7)
Mujeres, n (%)	0 (0)	1 (16.7)	1 (16.7)	2 (33.3)	1 (16.7)	1 (16.7)
P = 0.5163 para diferencias entre hombres y mujeres						
Genotipo MTHFR C677T						
	C/C		C/T		T/T	
Total, n (%)	10 (30.3)		19 (57.6)		4 (12.1)	
Hombres, n (%)	10 (37.1)		14 (51.9)		3 (11.1)	
Mujeres, n (%)	0 (0.0)		5 (83.3)		1 (16.7)	
P = 0.2027 para diferencias entre hombres y mujeres						
Genotipo MTHFR A1298C						
	A/A		A/C		C/C	
Total, n (%)	11 (33.3)		19 (57.6)		3 (9.1)	
Hombres, n (%)	7 (25.9)		17 (63.0)		3 (11.1)	
Mujeres, n (%)	4 (66.7)		2 (33.3)		0 (0)	
P = 0.1452 para diferencias entre hombres y mujeres						
Genotipo DHFR ins/del 19 bp						
	ins/ins		ins/del		del/del	
Total, n (%)	11 (33.3)		19 (57.6)		3 (9.1)	
Hombres, n (%)	8 (29.6)		17 (62.0)		2 (7.4)	
Mujeres, n (%)	3 (50.0)		2 (33.3)		1 (16.7)	
P = 0.4073 para diferencias entre hombres y mujeres						
Genotipo DHFR A317G						
	A/A		A/G		G/G	
Total, n (%)	10 (30.3)		20 (60.6)		3 (9.1)	
Hombres, n (%)	7 (25.9)		18 (66.7)		2 (7.4)	
Mujeres, n (%)	3 (50.0)		2 (33.3)		1 (16.7)	
P = 0.3163 para diferencias entre hombres y mujeres						
Genotipo DHFR C680A						
	A/A		A/C		C/C	
Total, n (%)	9 (28.1)		7 (21.9)		16 (50.0)	
Hombres, n (%)	7 (26.9)		6 (23.1)		13 (50.0)	
Mujeres, n (%)	2 (33.3)		1 (16.7)		3 (50.0)	
P = 0.9203 para diferencias entre hombres y mujeres						
Genotipo DHFR C1610G						
	C/C	C/G	G/G	C/T	G/T	
Total, n (%)	12 (37.5)	10 (31.2)	3 (9.4)	4 (12.5)	3 (9.4)	
Hombres, n (%)	9 (34.6)	9 (34.6)	2 (7.7)	4 (15.4)	2 (7.7)	
Mujeres, n (%)	3 (50.0)	1 (16.7)	1 (16.7)	0 (0)	1 (16.7)	
P = 0.6320 para diferencias entre hombres y mujeres						
Genotipo RFC1 A80G						
	A/A		A/G		G/G	
Total, n (%)	9 (27.3)		16 (48.5)		8 (24.2)	
Hombres, n (%)	8 (29.6)		11 (40.7)		8 (29.6)	
Mujeres, n (%)	1 (16.7)		5 (83.3)		0 (0)	
P = 0.1411 para diferencias entre hombres y mujeres						
Genotipo CCND1 A870G						
	A/A		A/G		G/G	
Total, n (%)	4 (12.1)		21 (63.6)		8 (24.2)	
Hombres, n (%)	3 (11.1)		18 (66.7)		6 (22.2)	
Mujeres, n (%)	1 (16.7)		3 (50.0)		2 (33.3)	
P = 0.7512 para diferencias entre hombres y mujeres						

TS: timidilato sintasa, MTHFR = metilenetetrahidrofolato reductasa, DHFR = dihidrofolato reductasa, RFC1 = transportador de folato reducido 1

Tabla 3. Correlación de los datos demográficos, antropométricos, metabólicos y sobre la grasa con el genotipo de la TS.

	Alta expresión TS (n = 15)	Baja expresión TS (n = 18)	P valor
Edad (a.)	45.0 (5.7)	44.0 (6.0)	0.5152
Varones, (%)	12 (80.0)	15 (83.3)	0.8051
Peso (kg)	72.0 (20.62)	64.5 (18.0)	0.4696
SIDA (%)	3 (20.0)	10 (55.5)	0.0724
VHB (%)	2 (13.3)	1 (5.5)	0.8538
VHC (%)	4 (26.7)g	7 (38.9)	0.7024
IMC	22.90 (5.14)	22.25 (5.55)	0.5629
Años de infección	13.0 (7.25)	13.0 (7.0)	0.5989
Circunferencia de la cintura (cm)	88.0 (18.0)	90.5 (14.0)	0.9280
WHR	0.93 (0.08)	0.94 (0.08)	0.4370
Colesterol total (mmol/l)	4.96 (1.95)	5.47 (2.32)	0.6908
Triglicéridos (mmol/l)	2.15 (0.72)	1.78 (1.35)	0.6776
HDL- colesterol (mmol/l)	1.15 (0.63)	1.13 (0.48)	0.7585
LDL- colesterol (mmol/l)	2.46 (1.1)	2.98 (2.25)	0.7042
VLDL- colesterol (mmol/l)	0.99 (0.33)	0.81 (0.41)	0.5386
Glucosa en ayunas (mmol/l)	5.30 (0.80)	5.50 (1.20)	0.6383
Insulina en ayunas (pmol/l)	52.0 (45.25)	64.0 (96.0)	0.5629
HOMA-r	1.00 (0.80)	1.35 (1.50)	0.3938
Score LSGS	2.5 (7.6)	7.5 (9.0)	0.0735
Score de lipodistrofia facial	0 (2.0)	2.0 (1.0)	0.0468
Porcentaje de grasa	20.21 (8.39)	18.93 (6.12)	0.8424
PA sistólica (mm Hg)	120 (19)	120 (20)	0.3101
PA diastólica (mm Hg)	75 (7.50)	74.5 (10.0)	0.2402
Grasa de todo el cuerpo (g)	11580 (6120)	11260 (1861)	0.2624
Grasa troncular (g)	9265 (4618)	8696 (4852)	0.3995
Grasa de pierna izquierda (g)	1012 (1154)	912 (488)	0.1993
Grasa apendicular (g)	3534 (2013)	3008 (1006)	0.0344
Ratio grasa troncular/grasa apendicular	2.237 (1.373)	2.816 (1.32)	0.1157
Síndrome metabólico (%)	9 (60.0)	8 (47.1)	0.4905
Aumento de CD4 (cells/mm ³)	439 (381)	381 (569)	0.8707
Aumento de CD8 (cells/mm ³)	638 (378)	522 (462)	0.4696
Descenso carga viral (log ₁₀ copies/ml)	3.38 (1.35)	3.39 (1.82)	0.8002

Los valores son expresados como una mediana (rango intercuartílico), a menos que se especifique.

SIDA=Síndrome de inmunodeficiencia adquirida, IMC =Índice de masa corporal, RCC =ratio cintura/ cadera, HDL =Lipoproteína de alta densidad, LDL = Lipoproteína de baja densidad, VLDL = Lipoproteína de muy baja densidad, HOMA-r = Homeostasis Model Assessment , LSGS = lipodistrophy severity grading scale, PA = presión arterial, g = gramos, m = meses, kg = kilogramos, mmol/l = milimoles por litro

Tabla 4. Exposición a fármacos antirretrovirales y el genotipo TS en la población estudiada

Parámetro	TS de alta expresión (n = 15)	TS de baja expresión (n = 18)	P valor
Composición de TAR actual			
Basado en IP	9 (60.0)	7 (38.9)	0.3490
Basado en NNRTI	2 (13.3)	5 (27.8)	
3 NRTIs	4 (26.7)	4 (22.2)	
IP+ NNRTI	0 (0)	2 (11.1)	
NRTI principal actual			
d4T+3TC	7 (46.7)	11 (61.1)	0.2867
d4T+TDF	7 (46.7)	4 (22.2)	
d4T+ddl	1 (6.7)	3 (16.7)	
Duración del TAR (m)	130 (61.7)	109.5 (37.0)	0.2327
Exposición acumulada a los fármacos individualmente			
Exposición a AZT (m)	0.0 (19.7)	0.0 (24.0)	0.9685
Exposición a AZT (g)	0.0 (572.2)	0.0 (360.0)	0.8126
Exposición a d4T (m)	117.0 (39.5)	103.0 (55.0)	0.1242
Exposición a d4T (g)	199.2 (139.5)	178.2 (117.0)	0.1532
Dosis d4T (mg/kg)	1.03 (0.18)	0.96 (0.28)	0.5035
Exposición a 3TC (m)	72.0 (69.0)	42.0 (77.0)	0.1471
Exposición a ddl (m)	216.0 (95.5)	151.2 (131.4)	0.0706
Exposición a DdC (m)	0.0 (7.5)	0.0 (0.0)	0.3366
Exposición a ABC (m)	0.0 (4.5)	0.0 (5.0)	0.8100
Exposición a TDF (m)	0.0 (0.0)	0.0 (4.0)	0.5427
Exposición a EFV (m)	13.0 (48.0)	5.5 (45.0)	0.4605
Exposición a NVP (m)	0.0 (19.2)	0.0 (8.0)	0.3743
Exposición a IP (m)	60.0 (61.2)	78.5 (83.0)	0.4473
Exposición a NRTI (m)	132.0 (36.7)	121.0 (44.0)	0.3743

Los valores son expresados como una mediana (rango intercuartílico). TAR =tratamiento antirretroviral, IP =inhibidores de la proteasa, NNRTI = inhibidores no análogos de la transcriptasa inversa, NRTI = inhibidores análogos de la transcriptasa inversa , d4T = estavudina, 3TC = lamivudina, TDF = tenofovir, ddl = didanosina, AZT = zidovudina, ddC = zalcitabina, ABC = abacavir, EFV = efavirenz, NVP = nevirapina

Tabla 5. Influencia de los genotipos de la TS, MTHDR, DHFR y RFC1 en los niveles intracelulares de d4T-TP

	d4T-TP (fmol/10 ⁶ cells)	P valor
Genotipo de TS		
2R/2R (n = 4)	24.55 (10.30)	0.0116
2R/3C (n = 9)	26.70 (38.97)	
2R/3G (n = 7)	10.10 (5.27)	
3C/3C (n = 5)	18.90 (8.02)	
3C/3G (n = 6)	11.20 (6.30)	
3G/3G (n = 2)	17.0 (7.80)	
Baja expresión (n = 18)	20.65 (12.70)	0.0010
Alta expresión (n = 15)	11.50 (5.75)	
Genotipo MTHFR C677T		
C/C (n = 10)	15.40 (15.60)	0.5999
C/T (n = 19)	18.90 (9.80)	
T/T (n = 4)	12.30 (11.70)	
Genotipo MTHFR A1298C		
A/A (n = 11)	13.10 (12.32)	0.1024
A/C (n = 19)	15.20 (9.60)	
C/C (n = 3)	28.50 (2.40)	
Genotipo DHFR ins/del 19 pb		
ins/ins (n = 11)	15.20 (9.82)	0.2606
ins/del (n = 19)	14.80 (16.67)	
del/del (n = 3)	52.10 (44.32)	
Genotipo DHFR A317G		
A/A (n = 10)	17.65 (10.60)	0.2576
A/G (n = 20)	14.40 (14.45)	
G/G (n = 3)	52.10 (44.32)	
Genotipo DHFR C680A		
A/A (n = 9)	20.90 (22.22)	0.4953
A/C (n = 7)	19.40 (23.05)	
C/C (n = 17)	14.80 (10.22)	
Genotipo DHFR C1610G		
C/C (n = 12)	16.70 (14.70)	0.9999
C/G (n = 10)	14.50 (15.60)	
G/G (n = 3)	20.60 (8.25)	
C/T (n = 4)	20.00 (42.55)	
G/T (n = 4)	15.90 (6.75)	
Genotipo RFC1 A80G		
A/A (n = 9)	10.10 (8.97)	0.1907
A/G (n = 16)	16.85 (12.65)	
G/G (n = 8)	20.00 (24.90)	
Genotipo CCNDI A870G		
A/A (n = 4)	10.30 (8.00)	0.1743
A/G (n = 21)	19.40 (14.45)	
G/G (n =)	14.35 (8.00)	

TS = timidilato sintasa, MTHFR = metilenetetrahidrofolato reductasa, DHFR = dihidrofolato reductasa, RFC1 = transportador de folato reducido 11, CCNDI = ciclina D1

RESUM

Antecedents:

L'activitat antiretroviral i la toxicitat de l'estavudina (d4T) depèn del seu metabòlit trifosfat, l'estavudina trifosfat (d4T-TP). Per tant, les modificacions dels nivells intracel·lulars de d4T-TP poden canviar el perfil de la toxicitat de l'estavudina.

Mètodes:

Es varen determinar els nivells intracel·lulars de d4T-TP a les cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (CBMC) per la prominència al cromatògraf líquid connectat a un espectròmetre de massa triple - quàdruple. Els polimorfismes dels gens de la Timidilat sintasa (TS), Metilentetrahidrofolat reductasa (MTHFR), dihidrofolat reductasa, transportador de folat reduït 1 (RFC1) i ciclina D1 (CCND1) varen ser determinades per seqüenciació directa utilitzant ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer o bé Fluidigm's Biomark system. Per l'anàlisi estadística es van utilitzar el test de la t de Student, l'índex de correlació de Pearson, ANOVA d'un factor amb correccions pel mètode de Bonferroni i una regressió logística esglaonada.

Resultats:

Es van reclutar 33 malalts per aquest estudi transversal. Els nivells intracel·lulars de d4T van ser de 11.50 (RIC: 5.75) fmol/10⁶ cels als malalts amb un genotip d'alta expressió del TS (*2/*3G, *3C/*3G and *3G/3G) mentre que per aquells amb un genotip de baixa expressió (*2/*2, *2/*3C and *3C/*3C), els nivells van ser de 20.65 (12.70) fmol/10⁶ cels (P = 0.0010). Els polimorfismes dels gens de MTHFR, DHFR, RFC1 i CCND1 no van influir en la concentració intracel·lular de d4T-TP.

Conclusions:

Els nivells intracel·lulars de d4T són determinats pels polimorfismes de timidilat sintasa.

Paraules clau: estavudina, estavudina-trifosfat, timidilat sintasa, metilentetrahidrofolat reductasa, dihidrofolat reductasa, ciclina D1, toxicitat, pools de nucleòtids, via metabòlica, farmacogenètica.